

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



J1000 U.S. PRO
09/885207
06/21/01

#5
AKD
11/19/01

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 100 29 520.7

Anmeldetag: 21. Juni 2000

Anmelder/Inhaber: Merck Patent GmbH, Darmstadt/DE

Bezeichnung: Beschichtung für metallische Implantatmaterialien

IPC: A 61 L 27/28

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 20. Februar 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Seller

**Merck Patent Gesellschaft
mit beschränkter Haftung
64271 Darmstadt**

**Beschichtung für metallische
Implantatmaterialien**

Beschichtung für metallische Implantatmaterialien

Die Erfindung betrifft eine biomimetisch erzeugte knochenanaloge Beschichtung bestehend aus einem organischen und anorganischen Hauptbestandteil für metallische Implantatmaterialien beliebiger Oberflächengeometrie sowie ein Verfahren zu deren Herstellung. Wesentliche Komponenten dieser Beschichtung sind Kollagen und Calciumphosphatphasen, die den organischen und anorganischen Hauptbestandteil des Knochens bilden. Die erfindungsgemäße Beschichtung eignet sich im besonderen Maße als Matrix zur Einbindung weiterer induktiver Substanzen wie z.B. Wachstumsfaktoren, Adhäsionsproteine oder pharmakologische Wirkstoffe.

Unter der Fragestellung einer verbesserten Anpassung der physikalisch-chemischen und biochemischen Eigenschaften der Oberflächen von Implantaten an das lokale Umgebungsgewebe mit dem Ziel der Optimierung der Biokompatibilität und –funktionalität werden verschiedene Ansätze verfolgt.

Neben reinen Veränderungen der Topographie der Implantatoberfläche, wie z. B. Ätzen oder Sandstrahlen, spielen momentan Beschichtungen mit Calciumphosphatphasen (CPP) eine bedeutende Rolle. In der Anwendung am weitesten fortgeschritten ist die Beschichtung von Implantaten im Knochenkontakt mit Hydroxylapatit und zunehmend auch leichter löslichen Calciumphosphatphasen [Yang et al, J. Mater. Sci.: Mater. in Med. **6**, 258-65 (1995); Remer, P. Schwerpunktprogramm Gradientenwerkstoffe, 3. Ausg. Darmstadt 31.3.1998; Floquet et al., Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac. 98, 47-9 (1997)]. Diese Methoden der Beschichtung von Implantaten mit der anorganischen Hauptkomponente von Knochen und davon abgeleiteten Verbindungen zielen besonders auf ein schnelleres Einwachsen des Implantats durch ein lokal erhöhtes Angebot an Calcium- und Phosphationen. Die Beschichtung von Implantatoberflächen mit CPP erfolgt zur Zeit überwiegend durch Plasmaspritzverfahren. Aufgrund der Prozeßbedingungen weisen diese Schichten Eigenschaften auf, die in

Kristallinität und Lösungsverhalten von der mineralischen Phase des Knochens stark abweichen und aufgrund der hohen Schichtdicken zum mechanischen Versagen der Schichten führen können [Filiaggi et al., J. Biomed Mat. Res. **27**(2), 191-8 (1993); Gross et al., Int. J. Oral Maxillofac. 5 Implants **12** (5), 589-97 (1997); Posner et al., Phosphate Minerals, Springer Verlag, Berlin/Heidelberg (1984)].

Elektrochemisch gestützte Verfahren [Shirkhanzadeh, J. Mater. Sci.:Mater. 10 in Med. 9, 76-72 (1998); Szmukler-Moncler et al., Biological Mech. Of Tooth Eruption, Resorption and Replacement by implants, (Eds. Z. Davidovitch and J. Mah), 481-85 Harvard Society for the Advancement of Orthodontics, Boston, USA (1998)] bieten die Möglichkeit, CPP mit geringeren Schichtdicken zu erzeugen. Die Abscheidung von CPP wird 15 durch kathodische Polarisation des Implantats in $\text{Ca}^{2+}/\text{H}_x\text{PO}_4^{(3-x)-}$ -haltiger Lösung realisiert. Die Polarisation des Implantats führt zu einer Alkalisierung des oberflächennahen Elektrolyten ($2\text{H}_2\text{O} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2 + 2\text{OH}^-$), wodurch vor der Probenoberfläche eine Fällungs-Reaktion ausgelöst 20 und das gebildete Fällungsprodukt auf der metallischen Implantat-oberfläche abgeschieden wird.

Ein weiterer Ansatz auf dem Gebiet der Oberflächenmodifizierung von 25 Implantatwerkstoffen besteht darin, eine Biologisierung von Implantatoberflächen zu erreichen, indem im Umgebungsgewebe vorkommende organische Verbindungen für die Oberflächenmodifizierung genutzt werden. Hierbei werden zum einen immobilisierte Proteine und Proteinsequenzen verwendet, die ihre Wirkung im immobilisierten Status 30 ausüben (Kollagen, Adhäsionsproteine, RGD-Sequenzen) bzw. Proteine die über einen bestimmten Zeitraum freigesetzt werden. Je nach immobilisierter Substanz wird dabei eine weitgehend allgemeine, positive Wirkung auf die Biokompatibilität der Implantatoberfläche (Kollagen, 35 bestimmte Adhäsionsproteine) oder die Adhäsion bestimmter Zelltypen

angestrebt (erweiterte RGD-Sequenzen)[Schaffner et al., J. of Mat. Sci.: Mat. in Med. 10, 837-39 (1999)]

Der vorangehend genannte Stand der Technik zeigt, dass Verfahren, die sich die Erzeugung einer knochenanalogen Verbundphase aus den mineralischen und organischen Bestandteilen des Knochens für die Beschichtung metallischer Implantate zum Ziel gesetzt haben, bisher nicht bekannt sind. Methoden, die sowohl Hydroxylapatit als auch Kollagen beinhalten, beschränken sich lediglich auf Mischungen der Komponenten, die zudem auf weitere körperfremde Stoffe als Trägermaterialien angewiesen sind.

Die WO 99/30672 (Uni Tübingen) beschreibt eine Beschichtung für Prothesen aus organischen Polymermaterial in deren Oberfläche Hydroxylapatit oder Kollagen eingebunden werden kann. Das Polymermaterial stellt hier lediglich den Haftvermittler dar, von einem knochenähnlichen Verbund von Kollagen und einer Calciumphosphatphase kann nicht gesprochen werden.

Eine weitere Möglichkeit der Einbindung von Skleroproteinen und Calciumphosphat wird in DE19811900 (Feinchemie) dargestellt. Ein biokompatibles Kompositmaterial, bestehend aus einem anorganischen Gel und einer bioaktiven Komponente (Kollagen, Elastin, Fibrin), wird beschrieben. Außerdem können Calciumphosphate oder deren Vorstufen in gelöster Form enthalten sein. Dieses Kompositmaterial stellt demnach nur eine Mischung der Hauptbestandteile des Knochens dar, die zudem auf ein anorganisches Gel als Träger angewiesen ist.

In WO 92/13984 (Queen's University of Kingston) wird ein Verfahren zur elektrochemischen Erzeugung keramischer Beschichtungen aus Calciumphosphatverbindungen beschrieben. Hierbei wird nicht ausgeschlossen, daß der Elektrolyt auch biologische nicht toxische Verbindungen wie Kollagen oder Verunreinigungen enthält. Die Beschichtung stellt ein einheitliches microporöses keramisches Material aus verbundenen nicht orientierten Kristalliten dar. Diese Schicht kann als

Ausfällungsprodukte auch biologisch aktive Verbindungen enthalten. Die beschriebene Beschichtung unterscheidet sich als keramische Calciumphosphatbeschichtung demnach deutlich von einer mineralisierten Kollagen-Calciumphosphat-Matrix.

5

Implantate für den Einsatz im Kieferbereich oder Gelenkersatz werden vorzugsweise aus metallischen Werkstoffen gefertigt, um den mechanischen Anforderungen gerecht zu werden. Dabei wird die unmittelbare Oberfläche, die sich in ihren Eigenschaften stark von dem Grundwerkstoff unterscheiden kann, oft vernachlässigt. Es ist jedoch bekannt, daß gerade die Eigenschaften der Oberfläche für die Wechselwirkungen zwischen Implantat und Umgebungsgewebe von entscheidender Bedeutung sind. So können Konformationsänderungen von adsorbierten Proteinen wesentlich zur Bildung einer fibrösen Zwischenschicht beitragen, die wiederum in einer unzureichenden Stabilität des Implantats resultieren kann.

10

Die Lehre der vorliegenden Erfindung geht von der Aufgabe aus, Implantatoberflächen gezielt mit biochemischen Informationen zu modifizieren, um nach der Implantation eine rasche Osteointegration unter Bildung hochwertigen Knochengewebes zu erreichen.

15

Diese Aufgabe wird durch eine knochenanaloge Beschichtung bestehend aus einem organischen und anorganischen Hauptbestandteil für metallische Implantatmaterialien beliebiger Oberflächengeometrie gelöst, wobei die Beschichtung im wesentlichen aus einer mit Calciumphosphat mineralisierter Kollagenmatrix besteht.

20

Als metallische Implantatmaterialien kommen generell alle in der Dentaltechnik oder in den Bereichen Endoprothetik und Trauma verwendeten Metalle in Frage. Besonders bevorzugt sind Titan und Titanlegierungen wie z.B. TiAl6V4.

25

Die erfindungsgemäße Beschichtung wird unter Bedingungen erzeugt, die das Einbeziehen von organischen Komponenten möglich macht. Die

30

35

Erfindung zur biomimetischen Erzeugung einer knochenanalogen Matrix nutzt deshalb elektrochemisch gestützte Prozesse, die bei nahezu physiologischen pH- und Temperaturbedingungen durchgeführt werden können und somit das Einbeziehen von Biomolekülen möglich machen.

- 5 Diese können in der Elektrolytlösung oder in immobilisierter Form an der Implantatoberfläche vorliegen. Die Hauptkomponenten der Schicht bestehen aus Kollagen und Hydroxylapatit, der organischen bzw. anorganischen Hauptkomponente des Knochens. Durch den erfindungsgemäßen Gegenstand ist es erstmalig möglich, ein
10 Durchdringungsgefüge analog der *in vivo* erzeugten Knochenstruktur in den wesentlichen Grundzügen *in vitro* nachzuvollziehen und mit guter Haftfestigkeit auf einer metallischen Implantatoberfläche zu erzeugen.
Der Aufbau der mineralisierten Kollagenmatrix erfolgt schichtförmig. Dies hat den Vorteil, dass hierdurch auch die Erzeugung gradierter Schichten
15 mit variierendem Mineralisierungsgrad der Kollagenmatrix möglich ist.

- Der anorganische Hauptbestandteil bzw. die Calciumphosphatphase (CPP) besteht bevorzugt aus amorphen Calciumphosphat ($\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6 \bullet n\text{H}_2\text{O}$), Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), Octacalciumphosphat ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \bullet \text{H}_2\text{O}$) oder Brushit ($\text{CaHPO}_4 \bullet 2\text{H}_2\text{O}$). Es sind aber auch Mischungen der vorher genannten Phasen möglich.

Die Calciumphosphatphase kann zusätzlich mit Ionen wie Fluorid, Silber, Magnesium oder Carbonat dotiert sein.

- 25 Bevorzugt ist die Verwendung von Typ I-Kollagen, welches im Knochen für die elastischen Eigenschaften verantwortlich ist und im mineralisierten Zustand zusammen mit den Hydroxylapatitkristalliten die hohe Festigkeit des Knochens bewirkt. Ferner kann das Kollagen auch aus einer Mischung der Typen I bis III bestehen. Die Typen I bis III gehören zu der Gruppe der Fibrillenbildenden Kollagene. Zusätzlich kann dem Kollagen Gelatine zugesetzt werden. Neben Kollagen, das auch aus rekombinanter Produktion stammen kann, ist auch die Einbeziehung anderer Matrixproteine möglich.

Ein weiterer Vorteil der Erfindung besteht in der Möglichkeit, die beschriebenen Schichten als Matix für knochenspezifische Proteine (BMP, TGF β etc.) zu nutzen. Neben Wachstumsfaktoren und zellspezifischen Adhäsionspeptiden ist auch die Einbindung pharmakologischer Wirkstoffe, wie z.B. Antibiotika, möglich.

5

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein metallisches Implantat aus einem Grundkörper und einer von diesem getragenen Außenschicht, wobei die Außenschicht aus der erfindungsgemäßen Beschichtung nach einen der Ansprüche 1 bis 8 besteht.

10

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur elektrochemisch gestützten Beschichtung von metallischen Implantatmaterialien beliebiger Oberfläche mit Kollagen und CPP gemäß Anspruch 11.

15

Die Beschichtung wird in einer Elektrolysezelle durchgeführt, in der das metallische Implantat kathodisch polarisiert wird. Die Schichtabscheidung erfolgt nahe physiologischen pH- und Temperaturbedingungen. Der Elektrolyt besteht aus einer $\text{Ca}^{2+}/\text{H}_x\text{PO}_4^{(3-x)}$ -haltigen Lösung, die zusätzlich Kollagen bzw. andere Substanzen (Wachstumsfaktoren, Antibiotika) enthalten kann. Die Implantatoberfläche kann jede beliebige Oberflächengeometrie (Struktur; rauh, poliert, geätzt), eine Calciumphosphatschicht, eine Proteinschicht sowie eine Schicht hergestellt nach Patent Nr. WO 98/17844 (TU Dresden) oder DE-19504386 (TU Dresden) oder eine Kombination derselben aufweisen. Durch einen simultan geführten Prozeß der Calciumphosphatabscheidung und der Immobilisierung von Kollagen unter physiologischen pH- und Temperaturbedingungen kann eine mineralisierte Kollagenschicht auf der Titanoberfläche erzeugt werden. Der Grad der Mineralisierung, d.h. Art der CPP und Bedeckungsgrad werden dabei durch die elektrochemischen Parameter vorgegeben.

20

25
30
35

Ferner bevorzugt ist ein Beschichtungsverfahren gemäß Anspruch 12, wobei zunächst eine Beschichtung der Probe mit CPP in einem

elektrochemischen Prozess über galvanostatische Polarisation in einer Calciumionen und Phosphationen enthaltenen Elektrolytlösung bei genau definierter Stromdichte und Temperatur, gefolgt von einer Beschichtung der mit CPP-beschichteten Probe durch Eintauchen in eine Kollagenlösung bei einem pH-Wert kleiner 8 und einer Temperatur zwischen 4 und 40°C für wenige Minuten erfolgt und anschließender Beschichtung der Kollagen-CPP-beschichteten Probe mit weiterem CPP in einem erneutem elektrochemischen Prozess über galvanostatische Polarisation unter genau definierter Stromdichte und Temperatur.

5

Die vorher genannten Verfahrensschritte können bevorzugt auch mehrfach alternierend ablaufen, d.h. eine Abfolge der Verfahrensschritte a) und b) gemäß Anspruch 11 nach dem Schema a-b-a-b-a-b usw.

10

15 Bevorzugt ist auch ein Verfahren gemäß Anspruch 14, wobei die Verfahrensschritte a) und b) in einem Schritt zusammengefaßt werden, wobei das zu beschichtende metallische Implantatmaterial in einer Calciumionen und Phosphationen enthaltenen Kollagenlösung kathodisch elektrochemisch polarisiert wird.

20

Noch bevorzugter ist ein Verfahren, in dem während der galvanostatischen Polarisation im Verfahrensschritt b) ein kathodischer Stromfluss von -0.5 bis -15 mA/cm² etwa 30 Minuten lang fließt.

25

Die Vorzüge der erfindungsgemäßen knochenanalogen mineralisierten Kollagenmatrix lassen sich eindrucksvoll im Zellversuch zeigen. Während die Zelladhäsion für Osteoblasten nach einer Stunde noch vergleichbar gute Werte mit biomimetisch erzeugten Hydroxylapatit-Schichten zeigt, ist die Zellproliferation auf den erfindungsgemäßen Schichten deutlich bevorzugt. Der Anstieg der Zellzahl erfolgt hier zu einem wesentlich früherem Zeitpunkt und der Maximalwert der Zellzahl wird sehr viel schneller erreicht als für reine Hydroxylapatit-Schichten. Eine entsprechende Meßkurve für einen Proliferationsversuch über 17 Tage mit MC3T3 Maus-Osteoblasten zeigt Abbildung 1.

30

35

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen unter Bezugnahme auf die Abbildung 1 näher beschrieben und erläutert.

5 Beispiel 1

Ein Zylinder aus TiAl6V4 ($h = 2 \text{ mm}$, $\varnothing 10 \text{ mm}$) wird metallographisch mit einer abschließenden TiO_2 -Politur präpariert. Der Zylinder wird anschließend in Aceton und Ethanol im Ultraschallbad gereinigt und mit 10 destilliertem Wasser gespült.

Die Probe wird anschließend in eine Kollagenlösung getaucht, die folgendermaßen hergestellt wird: Säurelösliches gefriergetrocknetes Kalbshautkollagen Typ I wird in 0,01M Essigsäure gelöst und auf eine Konzentration von 0,1mg/ml bei 4°C eingestellt. Die Rekonstitution der Kollagenmoleküle erfolgt in zwei Prozeßschritten; der pH-Wert-Einstellung auf 7,4 mit doppelt konzentriertem Phosphatpuffer und der Temperaturerhöhung auf 36°C . Nach 3 Stunden besteht die Lösung aus nativ 15 rekonstituierten Fibrillen. Die Probe verbleibt für 10 Minuten in dieser Konzentration. Danach wird sie mit deionisiertem Wasser gespült.

Die mit Kollagen beschichtete Probe wird als Arbeitselektrode in eine Drei-Elektroden-Anordnung, bestehend aus einer gesättigten Kalomelektrode als Bezugselektrode und einem Platinblech als Gegenelektrode in einer 20 thermostatisierten Elektrolysezelle eingebracht. Als Elektrolytlösung dient eine Stammlösung, die folgendermaßen hergestellt wird: Jeweils 10 ml Stammlösung von CaCl_2 und $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ in den Konzentrationen 33 mM und 20 mM werden verdünnt und gemischt, so daß 200 ml entstehen; 1,67 25 mM an Calcium- und 1,0 mM an Phosphationen. Der pH-Wert wird mit verdünnter NH_4OH -Lösung auf 6,4 eingestellt.

Nach Verbindung mit dem Potentiostaten erfolgt die Mineralisierung/Beschichtung mit Calciumphosphatphasen (CPP) über galvanostatische 30 Polarisation unter kathodischem Stromfluß bei -1 mA/cm^2 . Nach 30 Minuten wird die kathodische Polarisation beendet, die Probe aus der

Elektrolytlösung herausgeholt und mit deionisiertem Wasser gespült. Die abgeschiedene Schicht erscheint weißlich. Die elektronenmikroskopische Betrachtung zeigt eine Schicht, bestehend aus einem Kollagennetzwerk und kugeligen CP-Clustern. IR-spektroskopische Untersuchungen erbringen den Nachweis, daß die mineralische Phase aus amorphen Calciumphosphat besteht.

Beispiel 2

- Ein Zylinder aus TiAl6V4 wird wie im Beispiel 1 hergestellt. Der Aufbau der Elektrolysezelle und der Elektrolyt für die Calciumphosphatabscheidung sind dem in Beispiel 1 identisch.
- Nach Verbindung mit dem Potentiostaten erfolgt die Beschichtung mit CPP über galvanostatische Polarisation unter kathodischem Stromfluß bei -10 mA/cm². Nach 30 Minuten wird die kathodische Polarisation unterbrochen, die Probe aus der Elektrolytlösung herausgeholt und mit deionisiertem Wasser gespült. Auf der TiAl6V4-Oberfläche liegt jetzt eine kristalline CPP, Hydroxylapatit, vor. Die Probe wird jetzt in eine Kollagenlösung getaucht, die der in Beispiel 1 identisch ist. In dieser Lösung verbleibt die mit Hydroxylapatit beschichtet Probe für 10 Minuten, danach wird sie mit deionisiertem Wasser gespült und wieder in die Elektrolysezelle eingebaut.
- Nach Verbindung mit dem Potentiostaten erfolgt erneut eine Abscheidung von Hydroxylapatit über galvanostatische Polarisation unter kathodischem Stromfluß bei -10 mA/cm². Nach 20 min wird die Probe herausgenommen und mit deionisiertem Wasser gespült. Die abgeschiedene Schicht erscheint weißlich. Die elektronenmikroskopische Betrachtung zeigt eine geschlossene Schicht, die aus Agglomeraten kleiner Nadeln besteht. Auf dieser Schicht befindet sich ein Netzwerk aus mineralisierten Kollagenfibrillen. IR-spektroskopische- und Röntgenbeugungsuntersuchungen erbringen den Nachweis, daß die mineralische Phase aus Hydroxylapatit besteht. Die charakteristischen Amid-Banden im IR-Spektrum zeigen weiterhin, daß das Kollagen nicht denaturiert vorliegt,

vielmehr eine gute Übereinstimmung zwischen der mineralisierten Schicht und einem Spektrum für nativen Knochen besteht.

5

Beispiel 3

Ein Zylinder aus TiAl6V4 wird wie im Beispiel 1 hergestellt. Der Aufbau der Elektrolysezelle ist dem in Beispiel 1 identisch.

- 10 Eine Kollagenlösung mit nativ assemblierten Kollagenfibrillen wird wie im Beispiel 1 hergestellt. Diese Lösung wird für 15 min bei 5000 g und 4°C zentrifugiert, mit deionisiertem Wasser aufgenommen und durch Schütteln dispergiert. Anschließend wird die Lösung erneut für 15 min bei 5000 g und 4°C zentrifugiert. Das bei der Zentrifugation erhaltene Pellet wird jetzt in den Elektrolyten für die Calciumphosphatabscheidung, beschrieben in Beispiel 1, aufgenommen und durch eine Dispergierer homogenisiert. Diese Lösung dient als Elektrolyt für einen simultan geführten Prozeß der Abscheidung und Mineralisierung von Kollagen. Nach Verbindung mit dem Potentiostaten erfolgt die Mineralisierung über galvanostatische Polarisation unter kathodischem Stromfluß bei -10 mA/cm^2 . Nach 30 Minuten wird die kathodische Polarisation beendet, die Probe aus der Elektrolytlösung herausgeholt und mit deionisiertem Wasser gespült.
- 25 Die abgeschiedene Schicht erscheint weißlich. Die elektronenmikroskopische Betrachtung zeigt einen Verbund aus Kollagenfibrillen und CPP. IR-spektroskopische- und Röntgenbeugungsuntersuchungen erbringen den Nachweis, daß die Mineralisierung der Fibrillen hauptsächlich durch die kristalline Phase Hydroxylapatit erfolgt. Partiell ist die leichter lösliche amorphe Calciumphosphatphase anzutreffen. Die charakteristischen Amid-Banden im IR-Spektrum zeigen weiterhin, daß das Kollagen nicht denaturiert vorliegt, vielmehr eine gute Übereinstimmung zwischen der mineralisierten Schicht und einem Spektrum für nativen Knochen besteht.
- 30
- 35

Beispiel 4

Ein Zylinder aus TiAl6V4 wird wie im Beispiel 1 hergestellt. Der Aufbau der Elektrolysezelle und der Elektrolyt für die Calciumphosphatabscheidung sind dem in Beispiel 1 identisch.

Nach Verbindung mit dem Potentiostaten erfolgt die Beschichtung mit CPP über galvanostatische Polarisation unter kathodischem Stromfluß bei -10 mA/cm^2 . Nach 30 Minuten wird die kathodische Polarisation unterbrochen, die Probe aus der Elektrolytlösung herausgeholt und mit deionisiertem Wasser gespült. Auf der TiAl6V4-Oberfläche liegt jetzt eine kristalline CPP, Hydroxylapatit, vor. Die Probe wird jetzt in eine Kollagenlösung getaucht, die der in Beispiel 1 identisch ist. In dieser Lösung verbleibt die mit Hydroxylapatit beschichtete Probe für 10 Minuten, danach wird sie mit deionisiertem Wasser gespült und wieder in die Elektrolysezelle eingebaut.

Nach Verbindung mit dem Potentiostaten erfolgt eine partielle Mineralisierung des Kollagen unter kathodischem Stromfluß bei -10 mA/cm^2 für 15 min. Abschließend wird die Probe mit deionisiertem Wasser gespült. Die abgeschiedene Schicht erscheint weißlich. In einem zweiten Verfahrensschritt erfolgt die Anbindung integrinspezifischer zellselektiver Peptidsequenzen an die immobilisierte Kollagenschicht. Die Anbindung erfolgt kovalent über einen Thiolanker und SMPB (Sulfosuccinimidyl 4-(p-maleimidophenyl)butyrat) an die Phosphatgruppen des Kollagens.

Die elektronenmikroskopische Betrachtung zeigt eine homogene Schicht aus Hydroxylapatitnadeln, auf der ein partiell mineralisiertes Netzwerk aus Kollagenfibrillen vorliegt. Die Aktivität der RGD-Sequenzen wird aus Adhäsions- und Proliferationsexperimenten mit MC3T3-E1-Zellen ersichtlich. Gegenüber vergleichbaren reinen Kollagenschichten zeigen die RGD-beschichteten Oberflächen eine erhöhte Zelladhärenz und eine nach kürzeren Zeiten beginnende Zellproliferation.

Abbildung 1 zeigt die Zellproliferation von MC3T3 Maus Osteoplasten auf Hydroxylapatit und auf der knochenanalogen Kollagen-Hydroxylapatit-Matrix jeweils auf TiAl6V4-Substraten. Die Absorption ist proportional zur Zellzahl (WST-1 Test).

5

10

15

20

25

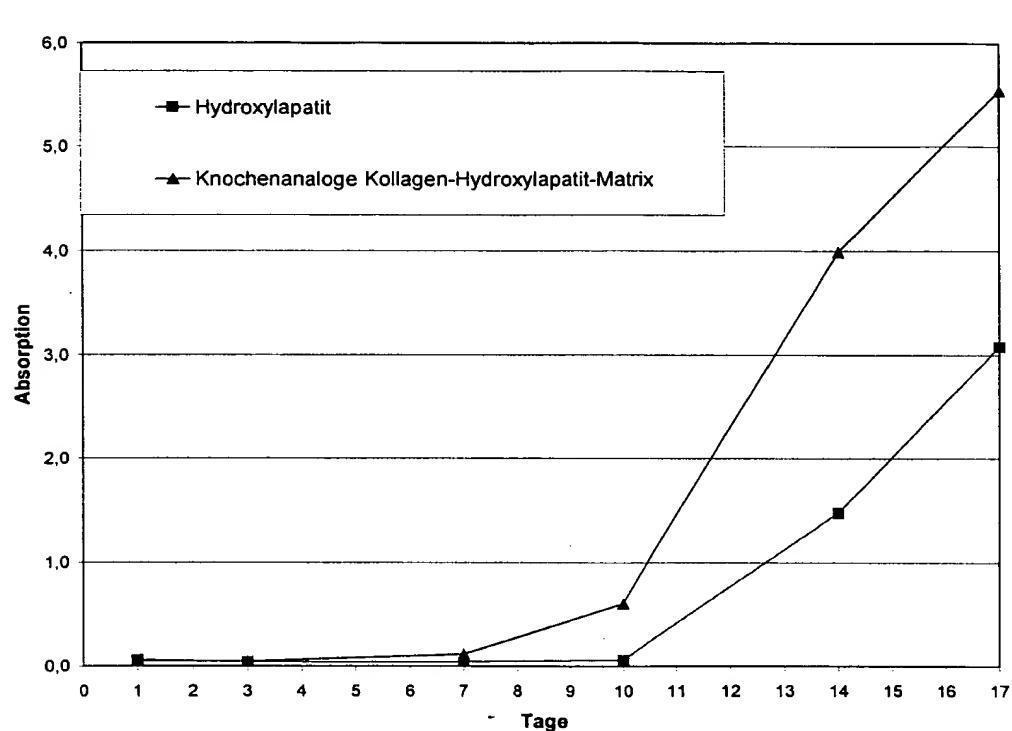


Abb.1

30

35

- 13 -

Zusammenfassung

Die Erfindung beschreibt eine biomimetisch erzeugte knochenanaloge
5 Beschichtung bestehend aus einem organischen und anorganischen
Hauptbestandteil für metallische Implantatmaterialien beliebiger
Oberflächen, wobei sie im wesentlichen aus einer mit Calciumphosphat
mineralisierter Kollagenmatrix besteht und ein Verfahren zur deren
Herstellung.

10

15

20

25

30

35

Patentansprüche

1. Knochenanaloge Beschichtung bestehend aus einem organischen und anorganischen Hauptbestandteil für metallische Implantatmaterialien beliebiger Oberflächengeometrie, dadurch gekennzeichnet, dass sie im wesentlichen aus einer mit Calciumphosphat mineralisierten Kollagenmatrix besteht.
2. Beschichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Aufbau der mineralisierten Kollagenmatrix schichtförmig ist.
3. Beschichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Calciumphosphatphase aus amorphen Calciumphosphat ($\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6 \bullet n\text{H}_2\text{O}$), Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), Octacalciumphosphat ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \bullet 5\text{H}_2\text{O}$) oder Brushit ($\text{CaHPO}_4 \bullet 2\text{H}_2\text{O}$) besteht.
4. Beschichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Calciumphosphatphase mit zusätzlichen Ionen wie Fluorid, Silber, Magnesium oder Carbonat dotiert ist.
5. Beschichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Kollagen aus Kollagen Typ I besteht.
6. Beschichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Kollagen eine Mischung aus Kollagen der Typen I bis III darstellt.
7. Beschichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass dem Kollagen Gelatine zugesetzt ist.
8. Beschichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass sie bioaktive Substanzen wie Wachstumsfaktoren, Peptidsequenzen, Hormone oder Antibiotika enthält.

9. Metallisches Implantat bestehend aus einem Grundkörper und einer von diesem getragenen Außenschicht, dadurch gekennzeichnet, dass die Außenschicht aus einer Beschichtung nach einen der Ansprüche 1 bis 8 besteht.
10. Metallisches Implantat nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass es aus Titan oder Titanlegierungen besteht.
11. Verfahren zur elektrochemischen Beschichtung von metallischen Implantatmaterialien beliebiger Oberflächengeometrie mit Kollagen und Calciumphosphatphasen (CPP), gekennzeichnet durch folgende Verfahrensschritte:
 - a) Beschichtung des metallischen Implantatmaterials durch Eintauchen in eine Kollagenlösung bei einem pH-Wert kleiner 8 und einer Temperatur zwischen 4 und 40 °C für wenige Minuten.
 - b) Beschichtung der Kollagen-beschichteten Probe mit CPP in einem elektrochemisch gestütztem Prozess über galvanostatische Polarisation in einer Calciumionen und Phosphationen enthaltenen Elektrolytlösung bei genau definierter Stromdichte und Temperatur.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass ein zusätzlicher Verfahrensschritt b) vor Verfahrensschritt a) vorangestellt wird.
13. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Verfahrensschritte a) und b) mehrfach alternierend ablaufen.
14. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Verfahrensschritte a) und b) in einem Schritt zusammengefaßt werden, wobei das zu beschichtende metallische Implantatmaterial in einer Calciumionen und Phosphationen enthaltenen Kollagenlösung kathodisch elektrochemisch polarisiert wird.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass während der galvanostatischen Polarisation im Verfahrensschritt b) ein kathodischer Stromfluss von -0.5 bis -15 mA/cm² etwa 30 Minuten lang fließt.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass der Aufbau der mineralisierten Kollagenmatrix schichtförmig erfolgt.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass dem Kollagen Gelatine zugesetzt wird.